

Antioksidativna aktivnost i kinetička analiza tokoferolnog ekstrakta iz različitih vrsta biljnih ulja

Antioxidant activity and kinetic analysis of tocopherol extract obtained from different types of vegetable oils

Paola Tijan^{1*}, Dalibor Broznić²

¹ Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka

² Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Rijeka

Sažetak. Cilj: Utvrditi razliku u antioksidativnoj aktivnosti maslinovog, suncokretovog, bučinog i crnog ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata te proučiti kinetiku i mehanizam reakcije između slobodnih radikala i antioksidansa. **Materijali i metode:** Antioksidativna aktivnost ulja i tokoferolnih ekstrakata mjerena je spektrofotometrijski uz uporabu DPPH' (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), dok je Trolox ekvivalent poslužio kao referentni standard za kvantifikaciju rezultata dobivenih DPPH' testom. Pomoću kinetičkih monofaznih i bifaznih matematičkih modela procijenjena je i analizirana inhibicija signala DPPH'. **Rezultati:** Vrijednost TEAC-a ukazuje da maslinovo i suncokretovo ulje (2,16 mmol/L) posjeduju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na crno (1,85 mmol/L) i bučino ulje (1,68 mmol/L), a ujedno i intenzivniju inhibiciju DPPH' radikala. Tokoferolni ekstrakti imaju puno slabiji antioksidativni učinak od analiziranih biljnih ulja, pri čemu je najdjelotvorniji ekstrakt suncokretova ulja koji čini 22,1 % antioksidativne aktivnosti ulja, a najslabiji ekstrakt bučina ulja sa samo 13,9 %. Nestanak DPPH' radikala u uzorcima ulja odvija se u dva susljedna koraka, početnog eksponencijalnog koji se odvija unutar 7 min reakcije, ovisno o vrsti ulja, i drugog sporog, gdje su promjene proporcionalne s vremenom. Kod tokoferolnih ekstrakata brzi korak reakcije nije uočen, ukazujući time da se reakcija odvija mehanizmom kinetike prvog reda. **Zaključak:** Rezultati ukazuju da biljna ulja imaju jači učinak u inhibiciji radikala u odnosu na tokoferolne ekstrakte, pa se njihovom pravilnom konzumacijom potpomaže organizmu u „borbi“ protiv slobodnih radikala. Zapravo, najvažniji dio antioksidacijskog sustava obrane organizma od slobodnih radikala čini sinergističko djelovanje antioksidansa, odnosno antioksidansi u sinergiji imaju jači učinak nego sumarni učinak svih pojedinačnih antioksidansa.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost; biljno ulje; DPPH'; kinetička analiza; TEAC; tokoferoli

Abstract. Aim: To determine the difference in the antioxidant activity of the olive, sunflower, pumpkin and black oil and their tocopherol extracts as well as to examine the kinetics and mechanism of reactions between free radicals and antioxidants. **Materials and Methods:** Antioxidant activity of the oils and tocopherol extracts was measured spectrophotometrically using DPPH' (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) while Trolox equivalent was used as a reference standard for the quantification of the results obtained by the DPPH' test. DPPH' signal inhibition was evaluated and analyzed by monophasic and biphasic kinetics mathematical models. **Results:** The TEAC values suggest that olive and sunflower oil (2.16 mmol/L) have a stronger antioxidant activity than black (1.85 mmol/L) and pumpkin oil (1.68 mmol/L) and they possess stronger inhibition of the DPPH' radical. Tocopherol extracts have a much

***Dopisni autor:**

Paola Tijan, univ. bacc. sanit. ing.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: paolatijan@gmail.com

Napomena: Rad je prezentiran na 10. studentskom kongresu Prehrana i klinička dijetoterapija (10. – 11. svibnja 2019., Rijeka; organizatori: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, FOSS MedRi) te je prema Uredništvu časopisa *Medicina Fluminensis* odabran za najbolje konferencijsko priopćenje.

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

weaker antioxidant effect than the analyzed vegetable oils, where the sunflower extract is most effective, making 22.1 % of the antioxidant oil activity, while the weakest extract is the pumpkin oil extract oil with only 13.9 %. DPPH[•] radical disappearance in oil samples takes place in two successive phases, the initial exponential which takes place within 7 min of the reaction, depending on the oil type, and the second slow phase where the changes are proportional to the time. The rapid reaction phase by tocopherol extracts was not noticed, indicating that the reaction takes places by the mechanism of the first order kinetics. **Conclusion:** The results indicate that vegetable oils have a stronger effect on the radical inhibition than the tocopherol extracts, and by their proper consumption they will support the organism in the "fight" against free radicals. In addition, the most important role of the antioxidant defense system against free radicals makes the synergic interactions among the different molecules present in the food, indicating that antioxidants in synergy have a stronger potential than the sum of all individual antioxidants.

Key words: antioxidant activity; DPPH[•]; kinetic analysis; TEAC; tocopherols; vegetable oils

UVOD

Posljednjih godina sve se više istražuju uzroci i posljedice oksidativnog stresa, kao i njegova uloga u etiologiji i progresiji brojnih humanih bolesti¹. U živom organizmu tijekom metaboličkih procesa nastaju reaktivni kisikovi spojevi, koji u velikom broju mogu uništiti strukturu biomolekula ili modificirati njihovu funkciju, dovodeći tako do disfunkcije i smrti stanice. U prevenciji bolesti i promociji zdravlja veliku važnost ima hrana bogata potrebnim nutrijentima². Njihovo pozitivno djelovanje očituje se u smanjenju štetnih učinaka slobodnih radikala u ljudskom organizmu, djelovanjem antioksidansa i smanjenjem broja oksidacijskih reakcija. Danas se vrlo često upotrebljava pojam „superhrana“ koji podrazumijeva hranu bogatu biološki aktivnim tvarima koje mogu djelovati kao inhibitori određenih enzima, kao „gasioci“ singletnog kisika, sudjelovati u reakcijama hvatanja slobodnih radikala ili razgradnji peroksida³. Dokazano je da povećana konzumacija ovakve hrane, koja je bogat izvor antioksidansa, prevenira različite humane bolesti, uključujući karcinom, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti^{4,5}. Upravo su se biljna ulja, čija uporaba sve više raste širom svijeta, poglavito u mediteranskom području, pokazala kao takva namirnica, tim više jer se dobivaju od plodova usjeva koji su vrlo rasprostranjeni u svijetu, stoga i vrlo

lako dostupna^{6,7}. U ljudskoj prehrani dominantnu ulogu ima suncokretovo ulje, a u današnje vrijeme sve se više koriste maslinovo i bučino ulje. Suncokretovo ulje odlikuje se stabilnošću pri višim temperaturama pa se preporučuje za prženje, dok pretjerano zagrijavanje maslinova ulja može uništiti njegove nutrijente, stoga ga je najbolje koristiti u salatama ili dodati na gotova jela. Bučino ulje ima vrlo dugu tradiciju proizvodnje i konzumacije, pogotovo u sjevernom dijelu Republike Hrvatske. Najčešće se koristi kao dodatak salatama, ali ga u

Biljna ulja imaju jači učinak u odnosu na tokoferolne ekstrakte, pa se njihovom konzumacijom potpomaže organizmu u borbi protiv slobodnih radikala. Najvažniji dio antioksidacijskog sustava obrane organizma od slobodnih radikala čini sinergijsko djelovanje antioksidansa, odnosno, antioksidansi u sinergiji imaju jači učinak nego sumarni učinak svih pojedinačnih antioksidansa.

zemljama Dalekog Istoka i nekim državama Afrike koriste za kuhanje⁸. Općenito, biljna ulja su visokovrijedne namirnice bogate biološki važnim nutrijentima kao što su bjelanjčevine, esencijalne masne kiseline, minerali (željezo, magnezij), vitamini (B, C, D, E i K) koji sprječavaju nastanak raznih bolesti⁹⁻¹³. U biološki aktivne komponente biljnih ulja ubraja se i vitamin E koji čini skupina tokoferola i tokotrienola, koji se zajedničkim imenom nazivaju tokoli. To su lipofilne komponente, derivati kroman-6-ola s 1 do 3 metilne skupine na aromatskom prstenu i nezasićenim (tokotrienoli) ili zasićenim (tokoferoli) izoprenoidnim lancem od 16 ugljikovih atoma na 2. položaju. Postoji 8 izomernih oblika, četiri tokoferola (α -, β -, γ - i δ - tokoferol) i četiri tokotrienola (α -, β -, γ - i δ - tokotrienol), koji se skupnim imenom nazivaju tokokromanoli. U biljnim uljima dominantniji su tokoferoli, među kojima prevladavaju α -, γ - i δ - tokoferoli, dok je β -tokoferol prisutan u vrlo malom udjelu. Naime, zahvaljujući hidroksilnoj skupini na kromanolnom prstenu koja može otpustiti vodikov atom i njime reducirati slobodni radikal, tokoferoli se ubrajaju u značajne antioksidanse. Polinezasićene masne kiseline staničnih membrana izrazito su osjetljive na oštećenja slobodnim radikalima, s obzirom na to da sadrže penta-1,4-diene kojima se lako uklanja

atom vodika u reakciji sa slobodnim radikalom. Pri toj reakciji nastaje lipoperoxid slobodni radikal, koji može napasti susjednu polinezasićenu masnu kiselinu i tako započeti lančanu reakciju s vrlo štetnim posljedicama za membransku strukturu. Uloga tokoferola je zaustaviti lančanu reakciju odnosno lipidnu peroksidaciju i spriječiti daljnja oštećenja, donirajući vodikov atom radikalu masne kiseline¹⁴⁻¹⁷. Proučavanje ovako složene reakcije moguće je utvrđivanjem kinetičkih parametara reakcije što će imati za posljedicu potpuniji uvid u antioksidativno ponašanje pojedinih spojeva. Općenito, kinetika reakcije, koja ovisi o specifičnim čimbenicima, služi kao najvažniji pokazatelj za pretpostavku mogućeg reakcijskog mehanizma, odnosno niz koraka prilikom kojih se reaktanti pretvaraju u produkte kemijske reakcije. Bolje razumijevanje mehanizama proučavanih reakcija moguće je postići analitičkim procjenama koje uključuju kinetičke, odnosno matematičke modele¹⁸⁻²⁰.

Ovo istraživanje bilo je usmjereno na praćenje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala od strane antioksidansa maslinova, suncokretova, bučina, crnog ulja, te njihovih tokoferolnih ekstrakata, a radi ispitivanja utjecaja sinergije antioksidansa na antioksidativnu aktivnost. Nadalje, proučavana je i uključenost pojedinih vrsta antioksidansa na mehanizam reakcije između slobodnih radikala i antioksidansa prisutnih u biljnim uljima i tokoferolnim ekstraktima.

MATERIJALI I METODE

Kemikalije i reagensi

Za pripremu uzoraka ulja i tokoferolnog ekstrakta korištene su kemikalije laboratorijske čistoće: kalij-hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska), etanol

(Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska), etilacetat (99,8 %; Fluka Chemicals, St. Gallen, Švicarska), L(+)-askorbinska kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka) te kemikalije HPLC čistoće: propan-2-ol, metanol, heksan (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska). Testovi antioksidativne aktivnosti provedeni su pomoću reagensa: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•] radikal; C₁₈H₁₂N₅O₆) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox, C₁₄H₁₈O₄) proizvođača Sigma-Aldrich Chemie, Merck (Taufkirchen, Njemačka).

Priprema uzoraka biljnih ulja za test antioksidativne aktivnosti

Analizirane su četiri vrste biljnih ulja kupljene u maloprodaji: suncokretovo ulje (uzorak SU) proizvođača „Zvijezda d. o. o.“ (Zagreb, Hrvatska), maslinovo ulje (uzorak MU) proizvođača „Monini S. p. A.“ (Spoleto, Italija), nerafinirano bučino ulje (uzorak BU) iz uljare „Poljo Posavec d. o. o.“ (Nedelišće, Hrvatska) te domaće crno ulje (uzorak CU) (mješavina nerafiniranog bučinog ulja i rafiniranog suncokretova ulja) proizvođača „Plodine d. o. o.“ (Rijeka, Hrvatska). U tablici 1 prikazane su hranjive vrijednosti navedenih ulja, njihova energetska vrijednost, udio masti, ugljikohidrata i bjelančevina u 100 mL ulja.

Priprema tokoferolnog ekstrakta iz analiziranih biljnih ulja

Tokoferoli su iz uzoraka ulja ekstrahirani sukladno metodi koju je predložio Xu²¹ s manjim prilagodbama. Prije ekstrakcije tokoferola ulja su podvrgnuta alkalnoj hidrolizi s kalijevim hidroksidom tako da se u odvagu ulja od 0,100 g (± 0,001 g) dodaje 0,05 g askorbinske kiseline te smjese alkohola (90,2 % etanola, 4,9 % metanola i 4,9 % pro-

Tablica 1. Energetska vrijednost, udio masti, ugljikohidrata i bjelančevina na 100 mL analiziranih biljnih ulja

Prosječna hranjiva vrijednost na 100 mL	Uzorci ulja			
	SU	MU	BU	CU
Energetska vrijednost (kcal/kJ)	828/3404	828/3404	827/3401	899/3695
Masti/ zasićene masne kiseline (g/g)	92/11	92/14	92/16	100/19
Ugljikohidrati (g)	0	0	0	0
Bjelančevine (g)	0	0	0	0,14

SU – suncokretovo ulje; MU – maslinovo ulje; BU – bučino ulje; CU – crno ulje

pan-2-ola) te 80 % otopine kalijevog hidroksida. Nakon inkubiranja 30 min u vodenoj kupelji zagrijanoj na 70 °C uzorci su ekstrahirani s n-heksanom i centrifugirani (Jouan BR4i multifunction centrifuge, Thermo Electron Corporation, Saint-Herblain, France) 15 min na 1000 x g kako bi se odijelio heksanski sloj, nakon čega je heksanski sloj uparen u struji dušika.

Određivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ulja i tokoferolnog ekstrakta DPPH testom

Sposobnost uzoraka ulja i tokoferolnih ekstrakata u inhibiranju radikala određena je DPPH[•] testom, odnosno nestanku DPPH[•] radikala zbog reakcije s antioksidansima prisutnima u ulju odnosno ekstraktu sukladno metodi koju su opisali Kalantzakis i sur.²² Uzorci ulja za test antioksidativne aktivnosti pripremljeni su vaganjem odgovarajuće mase ulja odnosno ekstrakta otapanjem u etilacetatu kako bi se postigla ishodna koncentracija od 0,05 g/mL. 1 mL svake otopine uzorka pomiješan je s 3 mL 0,1 mmol/L etilacetatne otopine DPPH[•] radikala. Smanjenje intenziteta DPPH[•] radikala određeno je mjerenjem apsorbancije smjese na 515 nm, koristeći spektrofotometar Cary 100 Bio WinUV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) uz etilacetat kao slijepu probu. Apsorbancija je mjerena svake min (za kinetičku analizu) tijekom 60 min kada je reakcija dosegla stabilno stanje. Ukupna antioksidativna aktivnost ulja i ekstrakata izračunata je kao postotak inhibicije DPPH[•] prema jednadžbi (1):

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ inhibicija} = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (1)$$

U jednadžbi 1, A_{kontrola} i A_{uzorak} predstavljaju apsorbancije etilacetatne otopine DPPH[•] bez uzorka kao negativnu kontrolu pri $t = 0$ min i apsorbanciju uzorka pri $t = 60$ min. Antioksidativni kapacitet izražen je TEAC testom pomoću Trolox ekvivalenta (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) koji je analog vitamina E. Opseg inhibicije DPPH[•] uspoređen je sa standardnom krivuljom Troloxa u rasponu 0 – 0,21 mmol/L. Kvantitativna analiza sposobnosti hvatanja radikala izražena je u mmolima Trolox ekvivalenta (TE) po kilogramu ulja odnosno ekstrakta prema jednadžbi (2):

$$\left(\frac{n(\text{TE})}{m(\text{ulja/ekstrakta})} \right) = \frac{c(\text{TE}) \cdot V_{\text{otopine}} \times 100}{m(\text{ulja/ekstrakta})} \quad (2)$$

U jednadžbi 2, $c(\text{TE})$ predstavlja koncentraciju Troloxa iz standardne krivulje koja je ekvivalentna DPPH[•] inhibiciji otopine ulja/ekstrakta, V je ukupni volumen (mL) otopine ulja/ekstrakta (10 mL), a m masa (g) uzorka ulja/ekstrakta.

Kinetička analiza inhibicije signala DPPH radikala

Inhibicija signala DPPH[•] radikala procijenjena je i analizirana pomoću kinetičkih matematičkih modela prikazanih jednadžbama:

Model kinetike prvog reda (KPR):

$$A_t = A_0 \times e^{-k_1 t} \quad (3)$$

Dvostruki eksponencijalni model prvog reda (DEPR):

$$A_t = A_1 \times e^{-k_1 t} + A_2 \times e^{-k_2 t} + A_r \quad (4)$$

U jednadžbama 3,4 A_0 , A_1 , A_2 i A_r su omjeri apsorbancije na početku reakcije, u vremenu t , u fazama 1 i 2 u vremenu $t = 0$ i rezidualni omjer, k_1 i k_2 su konstante brzine kemijske reakcije, t je vrijeme reakcije. Krivulje dobivene s pretpostavljenim matematičkim modelima prikazane su nelinearnim regresijskim modelima, dostupnim u komercijalnom programskom paketu Wolfram Research Mathematica® v. 9.0²³.

Statistička obrada podataka

Deskriptivna statistička analiza, kao i svi ostali statistički izračuni, provedeni su pomoću komercijalnog softvera Statistica® v. 13.0²⁴ na razini značajnosti $p < 0,05$. Testovi antioksidativne aktivnosti provedeni su na uzorcima od kojih su pripremljena četiri poduzorka, a svaki je poduzorak analiziran u duplikatu. Rezultati su izraženi kao medijan. Normalnost razdiobe podataka testiran je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Raspodjela se ne može opisati kao normalna, zbog čega su korišteni neparametrijski testovi. Statistička analiza antioksidativne aktivnosti analizirana je Kruskal-Wallisovim ANOVA testom, a razlike između pojedinih uzoraka ulja i ekstrakata pomoću Mann-Whitneyjeva U-testa. Slaganje rezultata predloženog matematičkog modela s eksperimentalnim podacima procijenjeno je pomoću koeficijenta determinacije (R^2 , jednadžba 5), koeficijenta varijacije srednjeg kvadratnog odstupanja (SRMSE; jednadžba 6 i pogreške hi-kvadrat testa (χ^2 pogreška; jednadžba 7):

$$R^2 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N (A_{\text{exp},i} - \bar{A}_{\text{exp},i})(A_{\text{mod},i} - \bar{A}_{\text{mod},i})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (A_{\text{exp},i} - \bar{A}_{\text{exp},i})^2 \sum_{i=1}^N (A_{\text{mod},i} - \bar{A}_{\text{mod},i})^2}} \right\}^2 \quad (5)$$

$$\text{SRMSE} = \frac{1}{A_{\text{exp},i}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (A_{\text{exp},i} - A_{\text{mod},i})^2}{N}} \quad (6)$$

$$\chi^2 \text{ pogreška} = 100 \times \sqrt{\frac{2}{\chi^2_{\text{tablično}} \sum_{i=1}^N \frac{(A_{\text{exp},i} - A_{\text{mod},i})^2}{A_{\text{exp},i}^2}}} \quad (7)$$

U jednadžbama 5, 6 i 7, A_{exp} , A_{mod} su eksperimentalne i vrijednosti dobivene modelom, $\bar{A}_{\text{exp},1}$ i $\bar{A}_{\text{mod},1}$ su srednje vrijednosti eksperimentalnih odnosno vrijednosti dobivenih modelom, N je broj mjerenja. Ovisnost konstanti brzine kemijske reakcije i sposobnosti hvatanja radikala (TEAC) testiran je neparametrijskim testom (Kendall-Tau) i višestrukom regresijskom analizom.

REZULTATI

Antioksidacijska aktivnost analiziranih biljnih ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata

Za procjenu antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka biljnih ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata te za objašnjenje mehanizama u kontroli kinetike reakcije korišten je test inhibicije DPPH' radikala. Kinetika nestanka DPPH' radikala u uzorcima prikazana je na slici 1, gdje je prikazana ovisnost gubitka DPPH' signala u odnosu na vremenski tijek reakcije. Kao što je vidljivo na slici

1, nestanak DPPH' radikala u uzorcima ulja odvija se u dva susljedna koraka; početnog, gdje je uočljiv brzi eksponencijalni nestanak DPPH', nakon čega slijede spore promjene proporcionalne s vremenom.

Vrijeme brzog koraka reakcije određena je Diskontinuiranim bifaznim modelom prvog reda (Model nije prikazan u radu) i grafički potvrđeno nagibom krivulje nestanka DPPH' u početnom koraku²⁵. Najdulje vrijeme brzog koraka reakcije postignuto je u uzorku ulja SU (6,86 min; tablica 2), a najkraće u uzorku MU (3,11 min). Na kraju brzog koraka reakcije, uzorci ulja MU i SU inhibirali su 49,85 odnosno 53,83 % početne količine DPPH', dok je postotak inhibicije za uzorke BU i CU bio manji i iznosio 30,37 odnosno 37,51 %. Također, na kraju reakcije ukupna količina inhibiranog DPPH' bila je značajno niža u uzorcima BU i CU (53,53 odnosno 59,56 %) u odnosu na uzorke SU i MU (69,51 odnosno 71,03 %). Iako je vrijeme prvog koraka reakcije nestanka DPPH' u uzorcima BU i CU identično (5,01 min) mogu se ipak uočiti male razlike u inhibiciji u brzom koraku kao i na kraju reakcije (tablica 2). Suprotno tome, kod uzorka MU postignuto je kraće vrijeme brzog koraka u odnosu na SU (3,11 odnosno 6,86 min) uz istovremenu jaču inhibiciju DPPH' što ukazuje da SU sporije reagira s DPPH', no na kraju reakcije postiže skoro istu antioksidativnu aktivnost kao i MU. Kod tokoferolnih ekstrakata postignuto je

Tablica 2. Antioksidativna aktivnost (RSA) uzoraka biljnih ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata u prvom (brzom) koraku reakcije i na kraju reakcije

Uzorak ulja / tokoferolni ekstrakt	t_1 /min	RSA ^a /%	RSA ^b /%
SU	6,86	49,85	69,51
MU	3,11	53,83	71,03
BU	5,01	30,37	53,53
CU	5,01	37,51	59,56
SUe	1,14	5,47	28,30
MUe	0,33	7,70	18,60
BUe	1,34	0,01	10,92
CUE	0,75	0,05	20,80

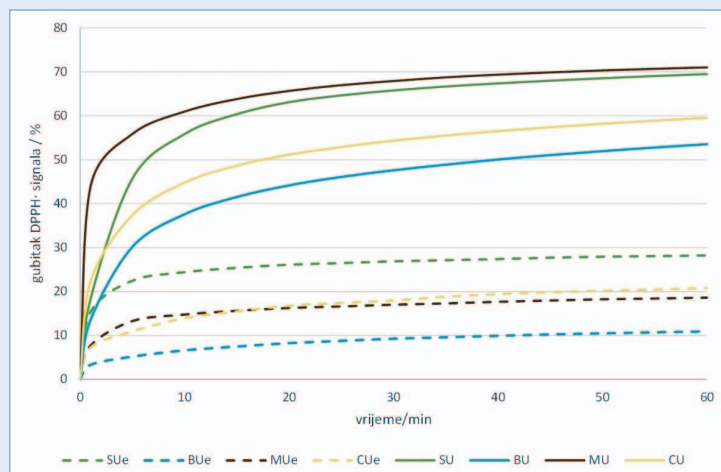
Vrijednosti su izražene kao medijan. t_1 – vrijeme brzog koraka reakcije inhibicije DPPH' radikala; ^a – postotak DPPH' radikala uhvaćen u brzom koraku reakcije; ^b – postotak DPPH' radikala uhvaćen na kraju reakcije. SUe – tokoferolni ekstrakt suncokretova ulja; MUe – tokoferolni ekstrakt maslinova ulja; BUe – tokoferolni ekstrakt bučina ulja; CUE – tokoferolni ekstrakt crnog ulja; Za skraćenice uzoraka ulja pogledati tablicu 1.

puno kraće vrijeme brzog koraka reakcije (tablica 2) u odnosu na analizirana ulja, ukazujući praktički na nepostojanje brzog koraka reakcije te drugačiji mehanizam reakcije između DPPH[•] i tokoferolnih ekstrakata. Također, inhibicija DPPH[•] bila je puno niža, kako u brzom tako i u sporom koraku reakcije u odnosu na analizirana ulja.

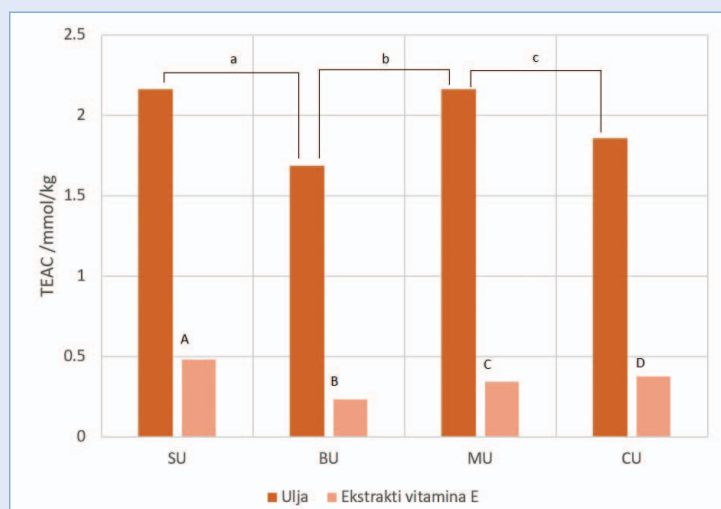
Kvantitativna analiza antioksidativne aktivnosti uzoraka ulja i tokoferolnih ekstrakata izražena kao koncentracija TEAC-a u mmol/kg ulja ili tokoferolnog ekstrakta za pojedini uzorak prikazana je na slici 2. Uzorci SU i MU posjeduju jednake TEAC vrijednosti (2,16 mmol/kg), dok su vrijednosti za CU i BU znatno niže i iznose 1,85 odnosno 1,68 mmol/kg. Razlike TEAC vrijednosti pojedinih vrsta ulja analizirane su statistički te je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između antioksidativne aktivnosti SU i BU ($p = 0,0233$), između BU i MU ($p = 0,0081$) i između MU i CU ($p = 0,0154$). Nisu pronađene statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između SU i MU, SU i CU te BU i CU (slika 2). Vrijednosti TEAC uzoraka tokoferolnih ekstrakata bile su znatno niže u odnosu na uzorke ulja i nalazile su se u rasponu od 0,23 (BUe) do 0,48 mmol/kg (SUE). Usporedbom TEAC vrijednosti nisu pronađene statistički značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između pojedinih uzoraka tokoferolnih ekstrakata. Nadalje, testirane su i razlike TEAC vrijednosti između antioksidativne aktivnosti uzoraka ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata te je utvrđena statistički značajna razlika na razini značajnosti $p < 0,05$ (slika 2).

Kinetička analiza inhibicije signala DPPH[•] radikala u analiziranim uzorcima biljnih ulja i njihovim tokoferolnim ekstraktima

Da bi se objasnio mehanizam koji kontrolira brzinu reakcije inhibicije DPPH[•] u uzorcima ulja i njihovih tokoferolnih ekstrakata eksperimentalni podaci testirani su KPR (jednadžba 3) i DEPR (jednadžba 4) kinetičkim matematičkim modelima, kako je objašnjeno u poglavlju Materijali i metode. Nakon razmatranja statističkih pokazatelja (R^2 , SRMSE i χ^2 pogreška) i prikladnosti slaganja rezultata dobivenih matematičkim modelima s eksperimentalnim rezultatima, može se zaključiti da bifazni kinetički model bolje opisuje reakciju inhibicije DPPH[•] od monofaznog modela u uzorci-



Slika 1. Gubitak signala DPPH[•] radikala u reakciji sa suncokretovim (SU), bučnim (BU), maslinovim (MU) i crnim uljem (CU) te tokoferolnim ekstraktima suncokretova (SUE), bučnim (BUE), maslinovim (MUE) i crnog ulja (CUE). Rezultati su prikazani kao medijan.



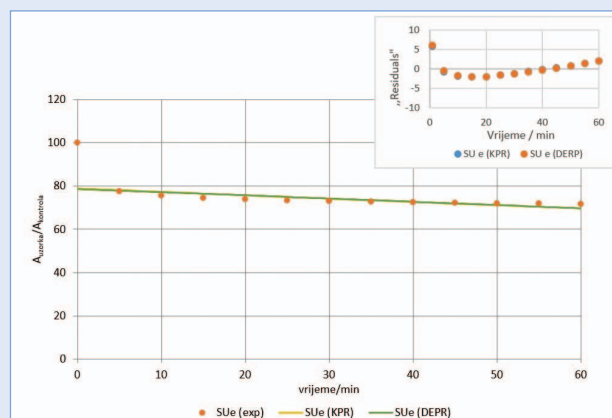
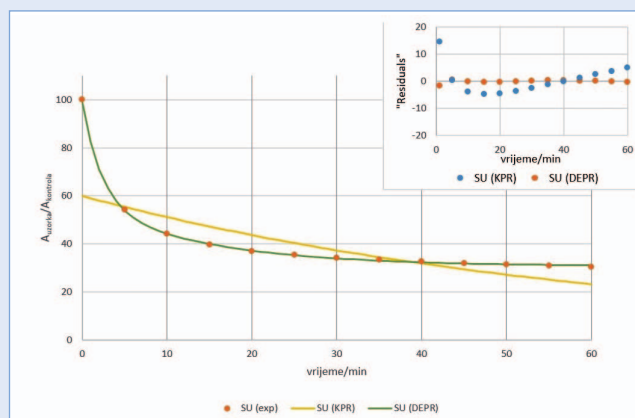
Slika 2. Antioksidativna aktivnost (DPPH[•] test) za suncokretovo (SU), bučino (BU), maslinovo (MU) i crno ulje (CU) te tokoferolnog ekstrakta suncokretova (SUE), bučina (BUE), maslinova (MUE) i crnog ulja (CUE). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između: a- SU i BU, b- BU i MU, c- MU i CU, A- SU i SUE, B- BU i BUE, C- MU i MUE i D- CU i CUE.

ma ulja, što potvrđuju visoki koeficijent determinacije i niske vrijednosti χ^2 pogreške tablica 3). Bifazno ponašanje inhibicije DPPH[•] za uzorak SU koji je odabran kao reprezentativni uzorak svih vrsta ulja prikazano je na slici 3a, gdje su eksperimentalni podaci preostalog DPPH[•] prikazani zajedno s krivuljama simuliranim s primijenjenim matematičkim modelima. Također je prikazan i tzv. „rezidualni“ prikaz (umetnut na sliku 3a) na

Tablica 3. Primijenjeni kinetički matematički modeli, procijenjeni kinetički parametri i statistički pokazatelji pri određivanju antioksidativne aktivnosti suncokretova (SU), maslinova (MU), bučina (BU) i crnog ulja (CU)

Model/parametar	Uzorci ulja			
	SU	MU	BU	CU
Model kinetike prvoga reda				
k_1 (1/min)	0,0158	0,0119	0,0930	0,0104
R^2	0,9633	0,9598	0,9916	0,9868
SRMSE	0,1997	0,2066	0,0919	0,1164
χ^2 pogreška (%)	17,65	18,27	8,14	10,30
Bifazni model kinetike prvoga reda				
A_1 (%)	42,96	49,93	26,37	30,45
A_2 (%)	25,82	21,73	27,90	28,40
k_1 (1/min)	0,4366	1,9382	0,0425	0,8799
k_2 (1/min)	0,0687	0,0744	0,4441	0,0609
R^2	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998
SRMSE	0,0086	0,0112	0,0063	0,0128
χ^2 pogreška (%)	0,78	1,02	0,57	1,16

k_1 i k_2 – konstante brzine kemijske reakcije; R^2 – koeficijent determinacije; SRMSE – koeficijent varijacije srednjeg kvadratnog odstupanja; χ^2 pogreška – pogreška hi-kvadrat testa. A_1 – udio DPPH' u prvom koraku reakcije; A_2 – udio DPPH' u drugom koraku reakcije.



Slika 3. Eksperimentalni podaci i teoretske krivulje dobivene testiranjem matematičkih modela kod reakcije inhibicije DPPH' u uzorcima: a) suncokretova ulja (SU) i b) tokoferolnog ekstrakta suncokretova ulja (SUE). (Oznake na slici: exp – eksperimentalne vrijednosti, KPR – vrijednosti dobivene testiranjem Modelom kinetike prvog reda, DEPR – vrijednosti dobivene testiranjem Dvostrukim eksponencijalnim modelom kinetike prvog reda. Rezultati su prikazani kao medijan. Umetnute slike predstavljaju „rezidualni“ dijagram slaganja eksperimentalnih podataka s vrijednostima dobivenih matematičkim modelom.)

kojem je uočljivo da su rezultati primijenjenog DEPR modela bliži nuli od KPR modela, što dodatno ukazuje na bifaznost reakcije inhibicije. Suprotno prethodno navedenom, kod uzoraka tokoferolnih ekstrakata uočeno je da jednostavniji KPR model jednako dobro opisuje ponašanje nestanka DPPH' kao i složeniji DEPR model (tablica 4, slika 3b). Sukladno svim dobivenim rezultatima, može se zaključiti da je primjena bifaznog DEPR modela prihvatljivija za opisivanje reakcije

inhibicije DPPH' u uzorcima ulja, dok je kod tokoferolnih ekstrakata opravdano primijeniti jednostavniji KPR model.

RASPRAVA

Budući da su biljna ulja složene smjese mnogih fitotkemikalija, vrlo teško je odrediti koja je od njih odgovorna za antioksidativno djelovanje. Osim toga, potrebno je poznavati udjele pojedinih antioksidativnih komponenti prisutnih u uljima, kao i

Tablica 4. Primijenjeni matematički modeli, procijenjeni kinetički parametri i statistički pokazatelji pri određivanju antioksidativne aktivnosti tokoferolnih ekstrakata suncokretova (SUE), maslinova (MUE), bučina (BUE) i crnog ulja (CUE)

Model/parametar	Uzorci tokoferolnog ekstrakta ulja			
	SUE	MUE	BUE	CUE
Model kinetike prvoga reda				
k_1 (1/min)	0,0020	0,0015	0,0012	0,0023
R^2	0,9982	0,9994	0,9998	0,9994
SRMSE	0,0417	0,0227	0,0100	0,0226
χ^2 pogreška (%)	3,69	2,01	0,89	1,99
Bifazni model kinetike prvoga reda				
A_1 (%)	44,94	27,36	25,48	35,58
A_2 (%)	44,94	27,36	25,48	35,58
k_1 (1/min)	0,0015	0,0020	0,0020	0,0025
k_2 (1/min)	0,0015	0,0021	0,0020	0,0024
R^2	0,9981	0,9994	0,9998	0,9994
SRMSE	0,0422	0,0232	0,0105	0,0238
χ^2 pogreška (%)	3,83	2,10	0,95	2,16

k_1 i k_2 – konstante brzine kemijske reakcije; R^2 – koeficijent determinacije; SRMSE – koeficijent varijacije srednjeg kvadratnog odstupanja; χ^2 pogreška – pogreška hi-kvadrat testa; A_1 – udio DPPH' u prvom koraku reakcije; A_2 – udio DPPH' u drugom koraku reakcije.

njihov sinergistički ili antagonistički utjecaj, stoga je provedeno ovo istraživanje o antioksidativnoj aktivnosti tokoferolnih ekstrakata izoliranih iz raznih vrsta biljnih ulja. Usporedba rezultata antioksidativne aktivnosti biljnih ulja u našoj studiji s drugim studijama vrlo je teško izvediva, jer svaki lokalitet na kojem raste biljka suncokreta, masline ili buče karakteriziran je različitim geološkim, hidrološkim i klimatskim obilježjima. Posljedica toga je različit kemijski sastav biljnih ulja te posljedično, različita i antioksidativna aktivnost. Rezultati antiradikalne aktivnosti uzoraka biljnih ulja, u našem istraživanju izraženi kao Trolox ekvivalent, bili su u rasponu od 1,68 do 2,16 mmol/kg ulja, s dominantnim djelovanjem uzoraka SU i MU. Vrlo slične rezultate dobili su Castelo-Branco i sur.²⁶ od 2,44 mmol/kg suncokretova ulja s područja Brazila, Pellegrini i sur. od 1,79 mmol/kg maslinova ulja s područja Italije²⁷, Nawirska-Olszanska i sur. i Prescha i sur 1,34 mmol/kg odnosno 1,44 mmol/kg ovisno o sorti buče^{28,29}. Međutim, u literaturi su pronađene i niže vrijednosti antioksidativne aktivnosti nego u ovoj studiji, maslinovo ulje s područja Austrije (0,97 – 1,25 mmol/kg)³⁰ i Hrvatske (0,55 – 1,30 mmol/kg, ovisno o sorti masline)³¹⁻³² suncokretovo ulje s područja Austrije (0,12 mmol/kg)³⁰, s područja

„Brzi“ i „spori“ antioksidansi prisutni u biljnim uljima u reakciji s radikalima uzrokuju bifaznost ponašanja nestanka radikala. Kod tokoferolnih ekstrakata inhibiciju radikala uzrokuju samo „spori“ antioksidansi. To ukazuje da se reakcija inhibicije radikala u biljnim uljima i ekstraktima odvija različitim reakcijskim mehanizmima.

Italije 1,17 (mmol/kg)²⁷. Isto tako, Zoumpoulakis i sur. pronašli su daleko više vrijednosti od 3,10 do 13,3 mmol/kg za suncokretovo ulje s područja Grčke³³. Dobiveni rezultati radicalske inhibicije u ovoj studiji ukazuju da tokoferolni ekstrakti imaju puno slabiji antioksidativni učinak od analiziranih biljnih ulja. Najdjelotvorniji je SUE koji čini 22,1 % antioksidativne aktivnosti ulja, a najslabiji BUE samo 13,9 %. Uz pretpostavku da su tokoferoli odgovorni za uklanjanje oko 40 % radikala³⁰ i uzimajući u obzir maseni udio tokoferola, kao i njihov doprinos uklanjanju radikala (A_1 i A_2), može se zaključiti da posjeduju različitu učinkovitost kao antioksidansi. Svakako ne treba zanemariti ni činjenicu da je najvažniji dio antioksidacijskog sustava obrane organizma od slobodnih radikala zapravo sinergističko djelovanje antioksidansa. Naime, dokazano je da djelovanje antioksidansa

u sinergiji ima jači učinak nego zbroj pojedinačnih učinaka antioksidansa³⁴. Također, neki autori zagovaraju koantioksidativnu aktivnost tokoferola i drugih antioksidansa prisutnih u hrani, kao što su askorbat i flavonoidi, te da dolazi do djelomične regeneracije između tokoferola (osobito δ -izomera) i flavonoida³⁵.

Dobiveni rezultati o kinetici inhibicije DPPH[•] radikala ukazuju na bifaznost reakcije nestanka radikala odnosno da se reakcija između radikala i antioksidansa u uljima odvija s dva različita mehanizma reakcije. Stoga je kinetički model DEPR odabran za detaljnije objašnjenje mehanizma reakcije. Općenito, reakcija između DPPH[•] radikala i antioksidansa prisutnih u uljima započinje prijenosom najslabije vezanog H-atoma s molekule antioksidansa na slobodni radikal. Novonastali slabije reaktivni radikal (A[•]) može reagirati s drugom molekulom DPPH[•] radikala ili reakcijom disproporcioniranja stvoriti stabilnije produkte. Dobiveni rezultati ovom studijom o bifaznosti procesa nestanka radikala u skladu su s nekoliko prethodnih studija. Espin i sur.¹⁹ koji su proučavali antioksidativnu aktivnost 57 jestivih biljnih ulja različitih vrsta i iz većeg broja europskih država (Francuske, Grčke, Italije, Španjolske i Turske) pretpostavili su da razlog bifaznog ponašanja može biti povezan sa složenošću reakcija koje se odvijaju između radikala i antioksidansa, budući da uključuju dvije različite skupine antioksidansa te se reakcije odvijaju različitim kemijskim putevima.

To znači da antioksidansi prisutni u ulju imaju različite sposobnosti u inhibiciji radikala, budući da reagiraju različitim brzinama te time uzrokuju dva koraka reakcije. Ukupna brzina reakcije određena je dvjema konstantama, k_1 i k_2 , koji predstavljaju brzinu nestanka DPPH[•] (jednadžba 4). Kod uzoraka ulja SU, MU i CU konstante brzine k_1 puno su veće u odnosu na konstante k_2 , što ukazuje da je kod ovih vrsta ulja ukupna brzina reakcije određena sporijim procesom odnosno drugim korakom reakcije. Kod uzorka ulja BU uočen je obrnut proces, odnosno da je ukupna brzina reakcije limitirana prvim korakom koji je sporiji proces u odnosu na drugi korak reakcije. Udio inhibiranog DPPH[•] u brzom koraku reakcije (A_1) kod uzoraka SU i MU bio je znatno veći od udjela u sporom

koraku reakcije (A_1), dok su kod uzoraka BU i CU udjeli u oba koraka reakcije bili približno jednaki (tablica 3). To potvrđuje prethodnu činjenicu o postojanju dvaju vrsta antioksidansa, „brzih“ i „sporih“, te različit mehanizam reakcije i kod uzoraka SU i MU u odnosu na BU i CU. Pod pretpostavkom da tijekom reakcije svi antioksidansi i „brzi“ i „spori“ prisutni u ulju reagiraju s DPPH[•] radikalom, konstante brzine reakcije mogu predstavljati brzinu nestanka antioksidansa. Nadalje, kako bi se ispitao mogući utjecaj konstanti brzine reakcije na sposobnost inhibiranja radikala, korišten je statistički neparametrijski test Kendall-Tau. Korelacijska analiza između TEAC vrijednosti i konstanti brzine dobivenih iz DEPR modela ukazuje da na prvu fazu nestanka DPPH[•] u uzorcima ulja pozitivno utječe k_1 (0,46), dok je odnos između TEAC i k_2 negativan (-0,15), ali njihov utjecaj nije bio statistički značajan na razini $p < 0,05$. Uz neparametrijski test korištena je i višestruka linearna regresijska analiza koja istovremeno uspoređuje antioksidativnu aktivnost (TEAC) i konstante brzine (k_1 i k_2), uz pretpostavku linearnog prediktivnog modela za TEAC vrijednosti. Ova analiza rezultirala je sljedećim korelacijama za TEAC:

$$\text{TEAC} = 0,0606 \times k_1 - 0,8113 \times k_2 + 2,0485 \\ (R^2 = 0,6044).$$

Jednadžba ukazuje da antioksidansi uključeni u drugi korak reakcije imaju ključni učinak na nestanak DPPH[•] u eksperimentalnim uzorcima ulja. Slično bifazno ponašanje nestanka DPPH[•] pronađeno je u istraživanju koje su proveli Broznić i sur. o antioksidativnoj aktivnosti bučinih ulja s područja Međimurja, Podravine i Slavonije¹⁸. Autori takvo ponašanje pripisuju prisutnosti antioksidativnih spojeva u matriksu koji imaju funkcionalne skupine sposobne za brzo i sporo doniranje vodikova atoma. Prema tome, spojevi koji pokazuju brzu i sporu antiradikalnu kinetiku imaju različite sposobnosti inhibiranja radikala te reagiraju različitim brzinom s radikalima u bifaznoj reakciji. Kod tokoferolnih ekstrakata ne može se govoriti o bifaznosti procesa zbog toga što su udjeli inhibiranog radikala u obje faze jednaki kao i njihove konstante (tablica 4), odnosno, mehanizam se odvija prema kinetici prvog reda s istom konstantom brzine kemijske reakcije tijekom cijelog procesa. Dakle, u tokoferolnom ekstraktu postoji vrlo

mali broj brzih antioksidansa koji mogu donirati slabo vezani H-atom s molekule antioksidansa na slobodni radikal.

ZAKLJUČCI

Rezultati dobiveni studijom ukazuju da konzumacijom biljnih ulja potpomažemo organizmu u „borbi“ protiv slobodnih radikala te da biljna ulja imaju jači učinak u inhibiranju radikala u odnosu na ekstrakte tokoferola. Može se zaključiti da je zapravo najvažniji dio antioksidacijskog sustava obrane organizma od slobodnih radikala sinergističko djelovanje antioksidansa, odnosno da antioksidansi u sinergiji imaju jači učinak nego sumarni učinak svih pojedinačnih antioksidansa. U analiziranim uljima utvrđen je bifazni mehanizam inhibicije radikala, stoga je predložen Dvostruki eksponencijalni model prvog reda za opis reakcije antioksidansa i radikala, ukazujući da antioksidansi mogu reagirati različitim brzinama s radikalima te time uzrokovati dva koraka reakcije. Za detaljnije proučavanje kinetike i mehanizma reakcije inhibicije DPPH[•] radikala potrebno je napraviti detaljnu kvantifikaciju tokoferolnog ekstrakta kao i ostalih skupina antioksidansa prisutnih u uljima te proučiti njihovo sinergističko/antagonističko djelovanje u odnosu na ishodna ulja, što će biti uključeno u naša buduća istraživanja.

Zahvala

Istraživanje je provedeno u okviru znanstveno-istraživačkog projekta broj 6.7.1.1.1.80 uz potporu Sveučilišta u Rijeci.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. La Vecchia C, Altieri A, Tavani A. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur J Nutr* 2001;40:261-7.
2. Terry P, Terry JB, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer an update. *J Intern Med* 2001;250: 280-90.
3. Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:61-8.
4. Tian H, Zhang H, Zhan P, Tian F. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of white apricot almond (*Amygdalus communis* L.) oil. *Eur J Lipid Sci Tech* 2011;113:1138-44.
5. Tian H, Zhan P, Zhang H. Development of fatty acid fingerprint of white apricot almond oil by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur J Lipid Sci Tech* 2014;116:126-33.
6. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CD et al. Free radicals and grape seeds proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000;148:187-97.
7. Rufino MSM, Alves RR, Fernandes FAN, Brito ES. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruit extracts. *Food Res Int* 2011;44:2072-5.
8. Gohari Ardabili A, Farhoosh R, Haddad Khodaparast MH. Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*) grown in Iran. *J Agric Sci and Technol* 2010;13: 1053-63.
9. Salgado PR, Drago SR, Molina Ortiz SE, Petrucci S, Andrich O, González RJ et al. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *Food Sci Technol* 2012;45:65-72.
10. Amakura Y, Yoshimura M, Yamakami S, Yoshida T. Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sunflower (*Helianthus annuus*) seed extract. *Phytochem Lett* 2013;6:302-5.
11. Rigacci S, Guidotti V, Bucciantina M, Parri M, Nediani C, Cerebai E et al. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *J Nutr Biochem* 2010;21:726-735.
12. Turner R, Etienne N, Garcia-Alonso M, De Pascual-Teresa S, Miniñane AM et al. Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *Int J Vitam Nutr Res* 2005;75:61-70.
13. Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 2007;190:181-86.
14. Lúcio M, Nunes C, Gaspar D, Ferreira H, Lima JLFC, Reis S. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro. *Food Biophys* 2009;4:312-20.
15. Yoshida Y, Saito Y, Jones LS, Shigeri Y. Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants. *J Biosci Bioeng* 2007;104:439-45.
16. Falk J, Munné-Bosch S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot* 2010;61:1549-66.
17. Marquardt D, Williams JA, Kučerka N, Atkinson J, Wassall SR, Katsaras J et al. Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. *J Am Chem Soc* 2013;135:7523-33.
18. Broznić D, Čanadi Jurešić G, Milin Č. Involvement of α -, γ - and δ -Tocopherol Isomers from Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil or Oil Mixtures in the Biphasic DPPH[•] Disappearance Kinetics. *Food Technol. Biotechnology* 2016;54:200-10.
19. Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J Agri Food Chem* 2000;48:648-56.
20. Terpin P, Bezjak M, Abramović H. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chem* 2009;115:740-744.

21. Xu Z. Analysis of tocopherols and tocotrienols. *Curr Protoc Food Anal Chemi.* 2002;D:D1-5.
22. Kalantzakis G, Blekas G, Pegklidou K, Boskou D. Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 2006;108:329–35.
23. Wolfram Research Mathematica® [internet], v. 8.0, Champaign, IL, USA: Wolfram Research Co. 2009. [cited 2019 Jul 15]. Available from: <http://www.wolfram.com/mathematica/>.
24. STATISTICA [internet], v. 8, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA; 2007. [cited 2019 Jul 15]. Available from: <http://www.statsoft.com>.
25. Broznić D, Ratkaj I, Malenica Staver M, Kraljević Pavelić S, Žurga P, Bubal D et al. Evaluation of the Antioxidant Capacity, Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Fir (*Abies alba* Mill.) Honeydew Honey Collected from Gorski kotar (Croatia). *Food Technol Biotech* 2018;56: 533-45.
26. Castelo-Branco VN, Santana I, Di-Sarli VO, Pereira Freitas S, Guedes Torres A. Antioxidant capacity is a surrogate measure of the quality and stability of vegetable oils. *Euro J Lipid Sci Technol* 2015;118:224-35.
27. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* 2003;133:2812-9.
28. Nawirska-Olszańska A, Kita A, Biesiada A, Sokół-Łętowska A, Kucharska AZ. Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chem* 2013;139:155-61.
29. Prescha A, Grajzer M, Dedyk M, Grajeta H. The Antioxidant Activity and Oxidative Stability of Cold-Pressed Oils. *J Am Oil Chem Soc* 2014;91:1291-301.
30. Fruhwirth GO, Wenzl T, El-Toukhy R, Siegfried Wagner F, Hermetter A. Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils. *Euro J Lipid Sci Technol* 2003;105:266-74.
31. Šarolić M, Gugić M, Tuberoso CI, Jerković I, Suste M, Marijanović Z et al. Volatile profile, phytochemicals and antioxidant activity of virgin olive oils from Croatian autochthonous varieties Mašnjača and Krvavica in comparison with Italian variety Leccino. *Molecules* 2014;19:881-95.
32. Šarolić M, Gugić M, Friganovic E, Tuberoso CIG, Jerković I. Phytochemicals and Other Characteristics of Croatian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils from Oblica, Lastovka and Levantinka Varieties. *Molecules* 2015;20:4395-409.
33. Zoumboulakis P, Sinanoglu VJ, Siapi E, Heropoulos G, Proestos C. Evaluating Modern Techniques for the Extraction and Characterisation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds Phenolics. *Antioxidants (Basel)* 2017;24:6:46.
34. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chem* 2012;130:1036-43.
35. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In vivo* 2006;20:823-7.